

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 43 232 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/04
C 08 B 37/00
C 07 K 14/00

⑳ Aktenzeichen: 195 43 232.0
㉔ Anmeldetag: 7. 11. 95
㉕ Offenlegungstag: 15. 5. 97

Best Available Copy

DE 195 43 232 A 1

㉚ Anmelder:

Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,
07745 Jena, DE

㉚ Erfinder:

Ermantraut, Jewgeni, 07745 Jena, DE; Wölfl, Stefan,
Dr., 07768 Kahla, DE; Saluz, Hans-Peter, Prof. Dr.,
07646 Oberbodnitz, DE

㉜ Herstellung einer Matrix-gebundenen miniaturisierten kombinatorischen Poly- und Oligomerbibliothek

㉜ Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung rationaler kombinatorischer Oligo- und Polymerbibliotheken auf festen Substraten. Dabei wird eine etablierte Synthesechemie genutzt. Die Bibliothek wird durch in-situ Synthese generiert. Durch Nutzung einer Stempeltechnik ist es möglich, sehr kleine Loci selektiv mit entsprechenden Reagenzien anzusprechen. Die laterale Auflösung kann bei Bedarf im Bereich der lithographischen Techniken, wie sie in der Mikrosystemtechnik üblich sind, angesiedelt werden. Mit entsprechend geeigneten Syntheseprozessen gelingt es, eine große Zahl molekularer Spezies auf kleine Flächen zu positionieren. Nach erfolgter Synthese ist die Position jeder der synthetisierten molekularen Spezies einzeln bekannt.

DE 195 43 232 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 97 702 020/592

6/24

Beschreibung

Molekulare Wechselwirkungen zwischen Polymeren und Liganden spielen eine wichtige Funktion bei biologischen Vorgängen. Geringe Änderungen in den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Polymeren und/oder Liganden können wesentliche Änderungen in der Wechselwirkung zwischen Polymer und Ligand verursachen. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften eines Liganden sollten idealerweise alle Sequenzvariationen des Polymers zur Verfügung stehen (Bibliothek). Die Wechselwirkung mit den Liganden sollte parallel untersucht werden können. Dies legt nahe, alle Polymervariationen auf einer Fläche unterzubringen, um diese in einem Schritt mit Liganden interagieren zu lassen. Damit wären identische Inkubationsbedingungen für alle Moleküle gegeben und ein direkter Vergleich möglich. Sind spezifische Wechselwirkungen bekannt, kann in weiteren Untersuchungen der Einfluß anderer Moleküle (wie Wirkstoffe) auf spezifische Wechselwirkungen durch gemeinsame Inkubation ermittelt werden. Diese Untersuchungen setzen das Vorhandensein einer Technologie voraus, die gestattet, kleine Mengen an Polymeren gezielt an definierten Stellen eines festen Trägers anzubringen. Da bei gegebener Monomernzahl M die Länge des Polymers L als Potenz eingeht, gilt für die Gesamtzahl G aller Variationen eines Polymers: $G = M^L$. Damit wird klar, das eine Miniaturisierung einer solchen Matrix ebenfalls notwendig wird. Dies ist auch in Anbetracht der Preise für die Reagenzien erstrebenswert.

Es existieren vielfältige Bemühungen Polymerbibliotheken anzulegen. Eine erfolgreiche Realisation dieses Vorhabens gelang Mitarbeitern der Firmen Affymax und Affymetrix (Combinatorial Chemistry — applications of light directed chemical synthesis; Jacobs, Jeffrey W.; Fodor, Stephen P.A.; Trends in Biotechnology, 1994, 12(1), 19—26). Hierbei wird eine neuartige Syntheschemie mit lichtsensitiven Schutzgruppen genutzt. Mittels geeigneter Masken, wie sie in der Photolithographie üblich sind, werden Moleküle auf definierten Bereichen einer Oberfläche aktiviert und so nach und nach Polymere mit definierten Positionen aufgebaut. So ist es bereits gelungen, alle Variationen eines Oligonucleotidocamers aufzubauen, was bedeutet, daß 65536 molekulare Spezies synthetisiert wurden (Light generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis; Pease, Ann C.; Solas, Dennis; Sullivan, Edvard J.; Cronin, Maureen, T.; Holm Christopher P.; Fodor, Stephen P.A.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1994), 91(11), 5022—6). Ebenfalls ist es mittels desselben Verfahrens und lichtaktivierbarer Aminogruppen gelungen, Peptidbibliotheken anzulegen (Light directed combinatorial peptide synthesis, Gruber, S.M.; Yu-Pang, P.; Fodor, Stephen P.A.; Proc. Am. Pep. Symp., 12th (1992), Meeting Date 1991, 489—91).

Ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotidbibliotheken wurde von Southern und Maskos beschrieben (Parallel synthesis and analysis of large numbers of related chemical compounds: applications to oligonucleotides; Southern, Edwin M.; Maskos, Uwe; J. Biotechnology (1994), 35(2-3), 217—27) und erfolgreich angewandt. Hierbei wurde die herkömmliche, aus der Festphasensynthese bekannte Chemie angewandt. Kapillaren wurden auf einem Träger geformt und diese mit Reagenzien gefüllt. Je nach Beladung der Kapillaren konnte so ein Nucleotid lokal spezifisch addiert werden. Beide Verfahren haben entscheidende Nachteile. Das

Verfahren von Affymax erfordert eine spezielle Schutzgruppenchemie, die nicht allgemein gebräuchlich und folglich kostenaufwendig und unausgereift ist. Dies führt zu Limitationen bei der Länge der zu synthetisierenden Polymere. Weiterhin werden photolithographische Synthesetechniken genutzt, die heute Standard in der Mikrostrukturtechnik sind. Dies macht ein Arbeiten im Reinstraum erforderlich, will man hohe räumliche Auflösungen erreichen. Nichtsdestotrotz sind physikalische Grenzen gegeben; selbst unter idealen Bedingungen sind Auflösungen von < 200 nm nicht zu erwarten ($\sqrt{2}$). Durch die Nutzung einer photolithographischen Apparatur bei jedem Syntheseschritt ist der Syntheseaufwand erhöht. Somit können mit diesem Verfahren keine langen Polymere synthetisiert werden; die Ränder sind nur im Rahmen der photolithographischen Technik scharf.

Das Verfahren von Southern und Maskos bietet zwar die Möglichkeit der Nutzung herkömmlicher Synthesereagenzien, ist aber hierbei unökonomisch, die Kapillaren müssen auf voller Länge mit dem Reagenz gefüllt werden. Auch ist bei Nutzung des beschriebenen Syntheseprozesses die Synthese aller Variationen einer Polymerlänge unmöglich. Das Verfahren ist im selben Maße, wie das zuvor beschriebene, miniaturisierbar. Allerdings ist die Mikrostrukturierung des Trägers selbst erforderlich.

Somit besteht ein Bedarf nach einem alternativen Verfahren zur Herstellung einer miniaturisierten Polymer- und Oligomerbank, bei dem die Nachteile der bekannten Verfahren vermieden werden. Die Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines entsprechenden alternativen Verfahrens.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Matrix-gebundenen miniaturisierten kombinatorischen Polymer- und Oligomerbibliothek von Nukleinsäuren, Peptiden, Zuckern und anderen chemischen Verbindungen, die durch Mehrschrittsynthese hergestellt werden, und Kombinationen daraus, unter Verwendung eines chemisch inerten Stempels, dessen aktive Oberfläche eine durch den gewählten Syntheseprozess vorbestimmte Mikrostrukturierung aufweist, wodurch ein selektives Ansprechen definierter Loci auf einem Substrat ermöglicht wird, und eines Substrats, bei dem es sich um einen festen inerten Träger handelt, auf dessen Oberfläche eine Monoschicht aus einem Linker mit einer terminalen geschützten funktionellen Gruppe kovalent gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß

- a. besagter Stempel in eine Lösung enthaltend ein für die Freisetzung der terminalen geschützten funktionellen Gruppen geeignetes Entschützungsreagenz getaucht wird,
- b. der mit dem Entschützungsreagenz benetzte Stempel mit dem besagtem Substrat in Kontakt gebracht wird, wodurch an den Kontaktflächen die terminalen funktionellen Gruppen freigesetzt werden,
- c. nach Waschen mit einem inerten Lösungsmittel das Substrat mit einem ersten aktivierten chemischen Baustein überschichtet wird, wodurch an den freigesetzten terminalen funktionellen Gruppen eine Kettenverlängerung durch den besagten chemischen Baustein erfolgt,
- d. die Synthesefolge der Schritte a—c beliebig oft wiederholt wird, bis die gemäß Syntheseprozess gewünschte Kettenlänge hergestellt ist, wobei bei jedem Syntheseschritt definierte Loci auf be-

sagtem Substrat durch Verwendung von Stempeln mit vorbestimmten Mustern angesprochen werden.

Die kombinatorische Polymerbibliothek befindet sich auf einem festen; gegenüber den bei den Syntheseschritten verwendeten Reagenzien inerten Träger (Matrix), der selbst nicht mikrostrukturiert sein muß. Es können sowohl ebene Flächen (Abb. 1, Schritt 1.1) als auch mikrostrukturierte genutzt werden. Diese Bedingungen werden von jedem der in der Mikrostrukturierung gebräuchlichen Wafer, z. B. Silizium/Siliziumoxid, aber auch von entsprechend poliertem Quarzglas, z. B. Suprasil, erfüllt. Die Oberfläche des festen Trägers ist über einen Linker und gegebenenfalls zusätzlich mit dem ersten chemischen Baustein verbunden (Abb. 1, Schritte 1.2 und 1.3). Im folgenden wird ein derartig präparierter fester Träger als Substrat bezeichnet.

Ein Linker ist eine geeignete chemische Verbindung zwischen der Trägeroberfläche und dem ersten chemischen Baustein. Das Linkermolekül ist frei wählbar und richtet sich nach der prospektiven Anwendung. Der Linker ist ein polyfunktionelles, insbesondere bifunktionelles Molekül, das mit separaten funktionellen Gruppen eine kovalente Bindung mit dem Träger und mit dem ersten chemischen Baustein bildet. Das Substrat enthält den Linker mit einer terminalen geschützten funktionellen Gruppe. Bei der Auswahl des geeigneten Linkers zur Herstellung einer Oligomer- oder Polymerbibliothek ist zu beachten, daß die Linker unter den gewählten Synthesebedingungen stabil sind. Solche Linker werden im Falle der Oligonucleotidsynthese z. B. aus 3-Glycidoxypolytrimethoxysilan oder 3-Aminopropyl-triethoxysilan hergestellt (Chemically Bonded Stationary Phases for Aqueous High Performance Exclusion Chromatography; Engelhardt, H. and Mathes, D.; Journal of Chromatography, 142 (1977) 311–320).

Der Linker kann auch bereits den ersten chemischen Baustein beinhalten oder wird in einem ersten Syntheseschritt mit dem ersten chemischen Baustein verknüpft. Ein chemischer Baustein ist grundsätzlich ein an seinen funktionellen Gruppen geschütztes, zum Aufbau von Oligomeren und Polymeren geeignetes Monomer (z. B. CE-Nucleotid-Phosphoramidite, FMoc-Aminosäuren, etc.). Dieser Baustein wird durch Entschützung (Freisetzung) der für die Kettenverlängerung vorgesehenen funktionellen Gruppe aktiviert und kann so mit geeigneten Gruppen (z. B. eines zweiten chemischen Bausteins) in Wechselwirkung treten. Ein weiterer Polymerisations- (Kettenverlängerungs-) Schritt wird somit eröffnet, wenn die hierfür notwendige funktionelle Gruppe des ersten Bausteins entschützt wird und so mit einer zuvor aktivierten funktionellen Gruppe eines zweiten chemischen Baustein reagieren kann. Dies erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren mit Hilfe eines topologisch definierten (mikrostrukturierten), gegenüber den bei den Syntheseschritten verwendeten Reagenzien inerten Stempels, so daß positionstreu nur auf den definierten (vorbestimmten) Bereichen des Substrats die Entschützung erfolgt (Abb. 1, Schritt 1.4). Derartige Stempeltechniken sind an sich bekannt (Patterning self assembled monolayers: Applications in Materials Science; Amit Kumar, Hans A. Biebuyck, George M. Whitesides; Langmuir, 1994(10), 1498–1511). Nach erfolgter Entschützung liegt ein entschützter Bereich auf der Oberfläche des Substrats vor (Abb. 1, Schritt 1.5), der mit einem aktivierten chemischen Baustein reagiert (Abb. 1, Schritt 1.6).

Nach diesem Verfahren ist prinzipiell die Synthese

aller Polymere und Oligomere möglich, solange diese unter den gewählten Bedingungen stabil sind (z. B. Nukleinsäuren, Peptide, Polysaccharide und andere chemische Verbindungen; die durch Mehrschrittsynthese hergestellt werden, z. B. Polyterpene, usw.). Für die Synthese werden dabei zur Herstellung von Oligonucleotiden, Polynucleotiden, Peptiden, Polysacchariden, etc. geeignete Monomere als chemische Bausteine eingesetzt. Weiterhin ist auch die Synthese von Mischpolymeren aus solchen chemischen Bausteinen durchführbar; so können z. B. mit einem Nukleinsäuretag versehene Glycopeptide aufgebaut werden. Die maximale Länge der synthetisierten Ketten ist abhängig von der Schritteffizienz (Ausbeute) der gewählten Synthesechemie.

Die Anordnung der Polymere auf der Trägeroberfläche resultiert aus dem gewählten Synthesealgorithmus, und dieser ist im Grunde frei wählbar. Die Polymere haben eine durch den Stempelalgorithmus bestimmte Länge und sind auf der Oberfläche eindeutig lokalisierbar. Die Methoden zur Synthese der erwähnten Polymere sind Stand der Technik.

Das Verfahren zur Herstellung der Polymerbibliothek gestaltet sich im Detail wie folgt:

Die Oberfläche des Trägers wird gereinigt und vollständig mit einem geeigneten Linker versehen. Dieser Linker trägt an der terminalen funktionellen Gruppe eine abspaltbare Schutzgruppe, oder es wird in einem zusätzlichen Schritt die gesamte Oberfläche mit einem ersten chemischen Baustein mit einer terminalen geschützten funktionellen Gruppe besetzt; in beiden Fällen ist die Oberfläche geschützt und kann selektiv lokal aktiviert werden. Die Stempel bestehen aus einem chemisch inerten Material, das organische Lösungsmittel adsorbiert, z. B. Poly-di-methyl-siloxan (PDMS), wodurch eine ausreichende Menge an Reagenzien zur Entschützung spezifischer endständiger funktioneller Gruppen positionstreu auf das Substrat aufgebracht werden und so die Kopplungsreaktionen an diesen Positionen auf dem Substrat erfolgen.

Stempel, deren aktive Oberfläche ein durch den gewählten Synthesealgorithmus vorbestimmtes Muster aufweist, werden wie folgt hergestellt. Ein Negativ der Stempel wird auf zuvor festgelegte Weise in der Photolackschicht beschichteter Wafer mikrostrukturiert und gereinigt (Abb. 2, Schritt 2.1). Die Mikrostrukturierung ermöglicht die Realisation des gewünschten Synthesealgorithmus. Damit wird auch die selektive Ansprache von definierten Bereichen auf einer Oberfläche möglich. Di-methyl-siloxan vermischt mit einem geeigneten Härter wird auf das Negativ gegeben und zur besseren Handhabung und zum Schutz vor Kontaminationen mit einer Glasplatte abgedeckt. Das ausgehärtete PDMS ist kovalent an das Deckglas gebunden (Abb. 2, Schritt 2.2), läßt sich aber problemlos vom Silizium und dem verbliebenen Photolack auf dem Stempelnegativ abziehen (Abb. 2, Schritt 2.3). Dieser Vorgang wird entsprechend wiederholt, bis alle für die Synthese notwendigen Stempelmuster hergestellt sind. Die Anzahl der für die Herstellung einer bestimmten Polymerbibliothek notwendigen mikrostrukturierten Stempel resultiert aus dem gewählten Synthesealgorithmus.

Um einen bestimmten Bereich auf dem Substrat zu aktivieren; wird der hierfür vorgesehene, spezifisch mikrostrukturierte Stempel mit dem Entschützungsreagenz beschichtet (Abb. 2, Schritt 2.4) und mit dem Substrat in Kontakt gebracht, d. h. auf das Substrat gedrückt. Die dem Stempel exponierten Stellen (Kontaktstellen) auf dem Substrat (Träger mit Linker und termi-

pylamin getaucht; das Gefäß wird dicht abgeschlossen und 8 h bei 80°C gehalten. Danach wird in Xylol und Ethylenglycol gewaschen. Das Glas wird in Ethylenglycol gestellt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Schwefelsäure auf 5 eingestellt; die Reaktion dauert 8 h bei 80°C. Nach Abschluß der Reaktion wird das Glas gründlich mit Methanol und Diethylether gewaschen und im Trockenofen getrocknet (Chemically Bonded Stationary Phases for Aqueous High Performance Exclusion Chromatography, Engelhardt, H. and Mathes, D., Journal of Chromatography, 142 (1977) 311–320). Damit befindet sich auf dem Glas eine Monoschicht aus Hydroxyethyloxyethyloxypropyl-siloxan, die bereitwillig mit Tetrazolyl Nucleotidphosphoramiditen (aktivierter chemischer Baustein) reagiert. Alle folgenden Herstellungsschritte werden bei Raumtemperatur und unter trockenem Schutzgas durchgeführt, da die genutzten Reagenzien feuchtigkeitsempfindlich sind (z. B. in einem Laborzelt (Atmosbag), das mit Argon befüllt wird). Ein beliebiges FOD (fast oligonucleotide deprotection)-Nucleotid-Phosphoramidit (z. B. FOD-dG-CE-Phosphoramidit), dessen 5'OH-Gruppe mit Dimethoxytrityl (DMT) geschützt ist, wird zu gleichen Teilen in Acetonitril und Tetrazol gelöst, so daß eine 0.1 M Lösung eines aktivierten Nucleotidphosphoramidits vorliegt. Diese Lösung wird auf das zuvor mit Acetonitril gewaschene Glas für 30 Minuten gegeben. Nach Waschen mit Acetonitril wird mittels einer 0.02 M Jod-Lösung (in Tetrahydrofuran; Pyridin und Wasser) das Phosphit zum Phosphat oxidiert und danach gründlich mit Acetonitril gewaschen. Damit liegt eine Di-methoxy-trityl-geschützte Oberfläche auf dem Glas vor.

Die Stempel werden nach dem in den Abb. 2 und 3 dargestellten Algorithmus hergestellt und angewandt. Jeder Syntheszyklus beinhaltet einen Stempelschritt und besteht aus einem einheitlichen Procedere: 1.) Waschen mit Dichlormethan (0,5 min), 2.) Entschützen der 5'-Hydroxylgruppe (Detritylierung, 5 min) mit 2% Trichloressigsäure (TCA) in Dichlormethan; erfolgt mit dem Stempel, 3.) mehrmaliges Waschen mit Acetonitril (jeweils 2,5 min), 4.) Kondensation (Zugabe von Tetrazolyl-Nucleotid-Phosphoramidit, 5 min), Kopplung erfolgt nur an zuvor entschützten Stellen; 5.) Waschen mit Acetonitril (2,5 min), 6.) Oxidation mit 0,02 M Jod in Tetrahydrofuran, Pyridin und Wasser (5 min), 7.) Waschen mit Acetonitril (2 min). Damit ist ein Syntheszyklus abgeschlossen.

Die verwendeten Lösungen und Reagenzien sind Standard in der FOD-Phosphoramidit-Nucleotidsynthese (Models 392—394 DNA/RNA Synthesizers, Users Manual, ABI, 1992). Die Waschlösungen werden über die Oberfläche kontinuierlich gespült, die Reagenzien verbleiben auf der Oberfläche für die angegebene Zeit.

Nach den ersten vier Stempelschritten sind vier Oligonucleotide mit der Länge 1 synthetisiert. Nach vier weiteren Stempelschritten sind 16 Oligonucleotide der Länge 2 synthetisiert, und nach weiteren vier Stempelschritten sind 64 Oligonucleotide der Länge 3 synthetisiert. Die terminalen Schutzgruppen werden mit 20%iger TCA abgespalten, vorhandene Schutzgruppen der exocyclischen Aminogruppen der Basen (Dimethylformamid-Gruppe bei Adenosin und Guanodin und Isobutyryl-Gruppe bei Cytidin, Thymidin besitzt keine exocyclische Aminogruppe) und am Phosphat (β -Cyanoethyl-Gruppe) werden mit konzentrierter Ammoniak-Lösung abgespalten (1 h bei 55°C oder 8 h bei Raumtemperatur). Der verwendete Linker ist bei allen Schritten stabil, so daß nach vollständiger Entschützung die Oli-

stabil, so daß nach vollständiger Entschüttung die Sch

stabil, so daß nach vollständiger

stabil, so daß nach vollständiger

stabil, so daß nach vollständiger

stabil, so daß nach vollständiger

gonucleotide am Träger verbleiben. Damit ist die Oligonucleotid-Trimer-Bibliothek hergestellt. Die Ausbeute wird durch Absorptionsmessungen der abgespaltenen DMT-Gruppen bestimmt und ist nahezu quantitativ.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Matrix-gebundenen miniaturisierten kombinatorischen Polymer- und Oligomerbibliothek von Nukleinsäuren, Peptiden, Zuckern und anderen chemischen Verbindungen, die durch Mehrschrittsynthese hergestellt werden; und Kombinationen daraus, unter Verwendung eines chemisch inerten Stempels, dessen aktive Oberfläche eine durch den gewählten Syntheselgorithmus vorbestimmte Mikrostrukturierung aufweist, wodurch ein selektives Ansprechen definierter Loci auf einem Substrat ermöglicht wird, und eines Substrats, bei dem es sich um einen festen inerten Träger handelt, auf dessen Oberfläche eine Monoschicht aus einem Linker mit einer terminalen geschützten funktionellen Gruppe kovalent gebunden ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß

a. besagter Stempel in eine Lösung enthaltend ein für die Freisetzung der terminalen geschützten funktionellen Gruppen geeignetes Entschützungsreagenz getaucht wird,

b. der mit dem Entschützungsreagenz benetzte Stempel mit dem besagtem Substrat in Kontakt gebracht wird, wodurch an den Kontaktflächen die terminalen funktionellen Gruppen freigesetzt werden,

c. nach Waschen mit einem inerten Lösungsmittel das Substrat mit einem ersten aktivierten chemischen Baustein überschichtet wird, wodurch an den freigesetzten terminalen funktionellen Gruppen eine Kettenverlängerung durch den besagten chemischen Baustein erfolgt,

d. die Synthesefolge der Schritte a—c beliebig oft wiederholt wird, bis die gemäß Syntheselgorithmus gewünschte Kettenlänge hergestellt ist, wobei bei jedem Syntheseschritt definierte Loci auf besagtem Substrat durch Verwendung von Stempeln mit vorbestimmten Mustern angesprochen werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der chemische Baustein ein an seinen funktionellen Gruppen geschütztes, zum Aufbau von Oligomeren und Polymeren geeignetes Monomer ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als chemischer Baustein ein zur Herstellung von Oligonucleotiden, Polynucleotiden, Peptiden, Polysacchariden oder entsprechenden Mischpolymeren geeignetes Monomer eingesetzt wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Abbildung 1) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES SYNTHESCHRITTES

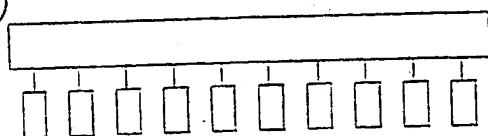
1.1)



TRÄGER

+ LINKER

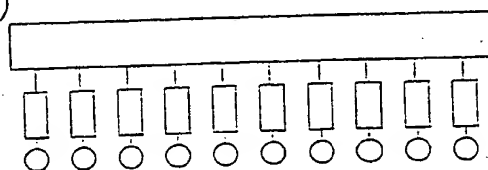
1.2)



TRÄGER MIT LINKER

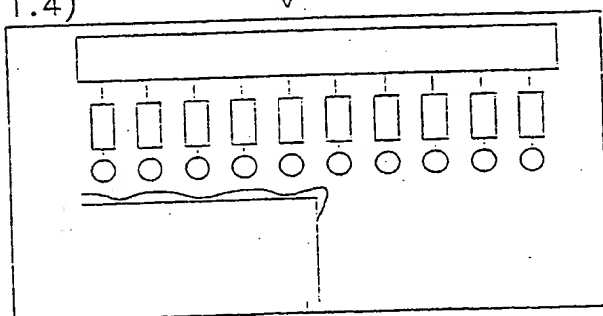
+ AKTIVIERTER CHEMISCHER BAUSTEIN

1.3)



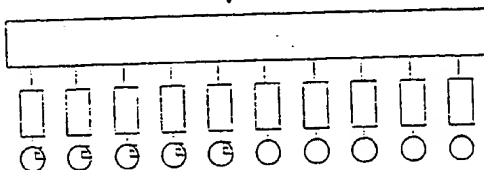
TRÄGER MIT LINKER
UND ERSTEM CHEMISCHEN
BAUSTEIN

1.4)



ENTSCHÜTZUNG MIT
STEMPEL

1.5)



+ NÄCHSTER AKTIVIERTER
CHEMISCHER BAUSTEIN

1.6)

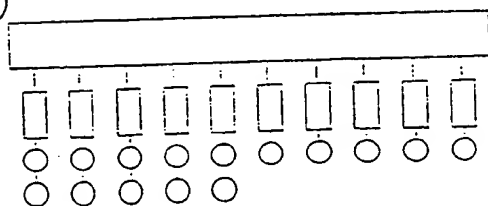


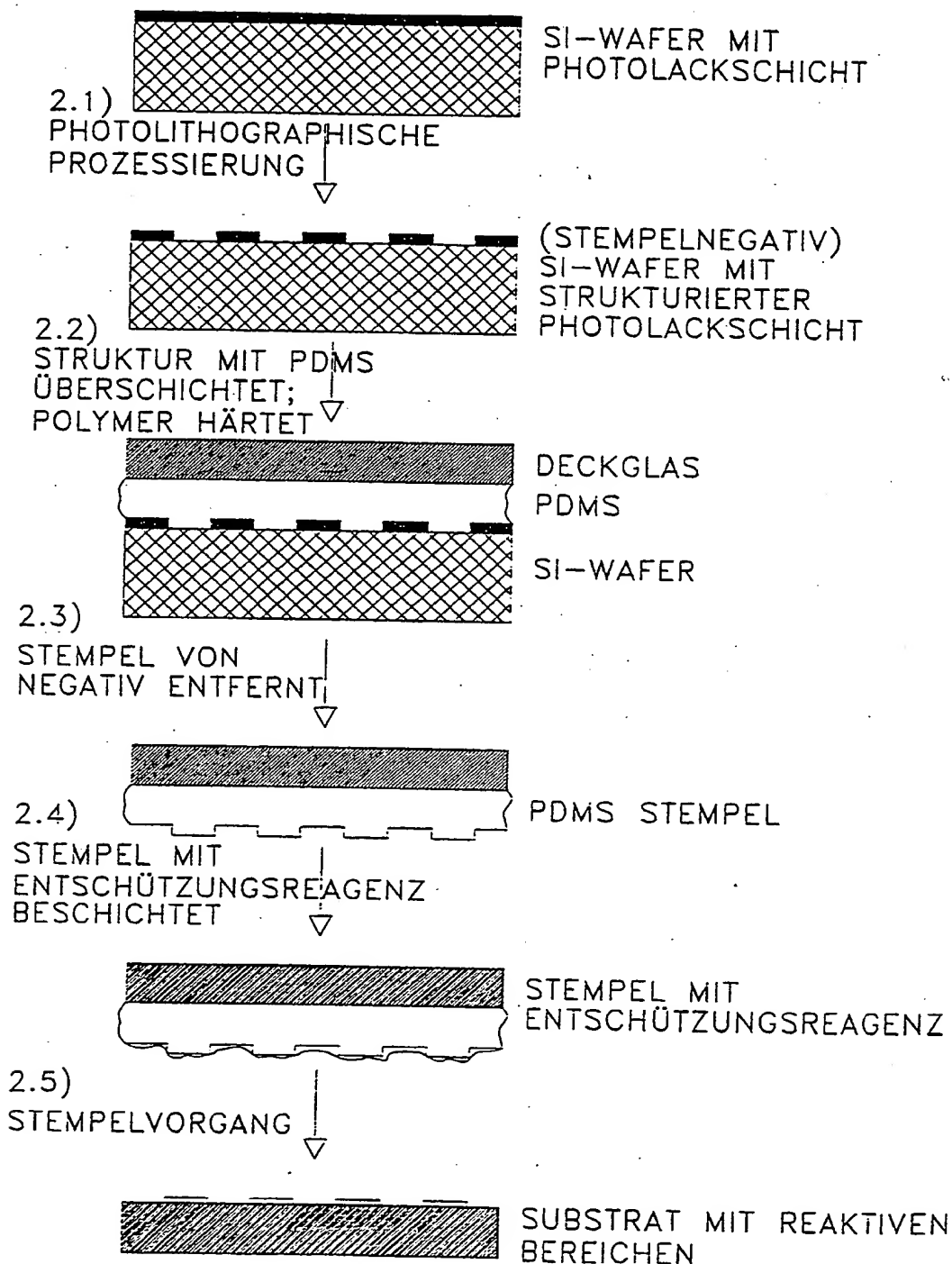
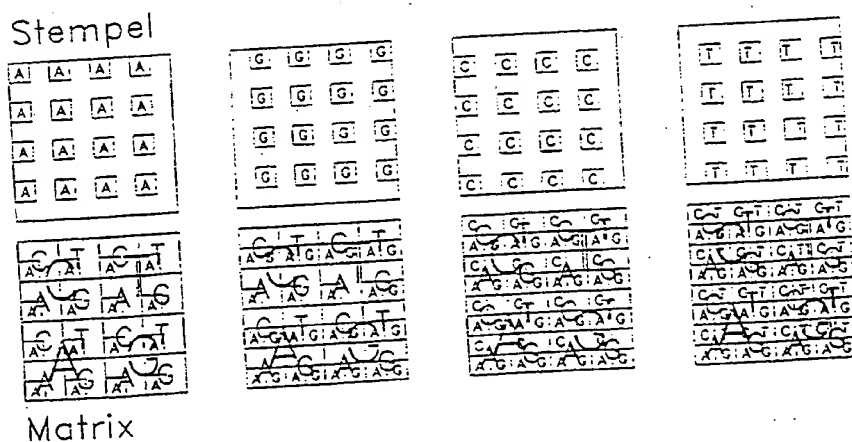
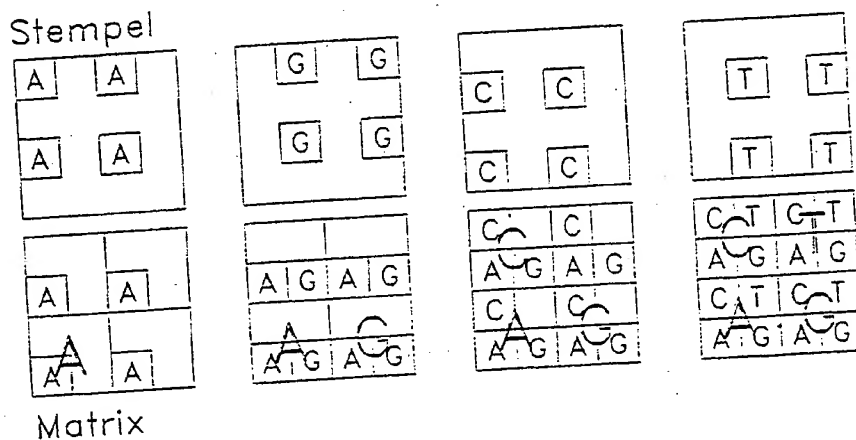
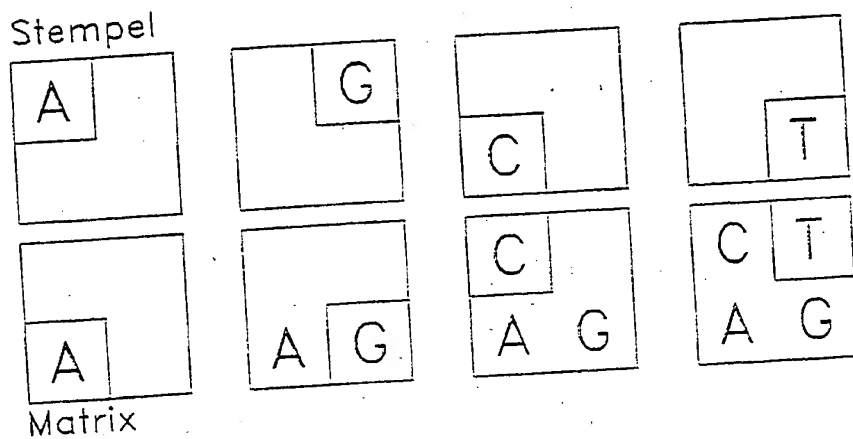
Abbildung 2) HERSTELLUNG DES STEMPELS
UND STEMPELVORGANG

Abbildung 3) Beispiel für die Synthese eines
Oligonucleotidtrimers mittels der Stempeltechnik



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)